



COMUNICADO  
TÉCNICO

252

Fortaleza, CE  
Junho, 2019

**Embrapa**

## Liofilização de *Lactobacillus* spp. Isolados de Queijos de Coalho Artesanal

Laura Maria Bruno  
Larissa de Sousa Moreira  
Antônia Samara Patricio Santos

# Liofilização de *Lactobacillus* spp. Isolados de Queijos de Coalho Artesanal<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> Laura Maria Bruno, engenheira de alimentos, doutora em Ciências Biológicas, pesquisadora da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE  
Larissa de Sousa Moreira, graduanda em engenharia de alimentos, Universidade Federal do Ceará, bolsista PIBIC Embrapa, Fortaleza, CE  
Antônia Samara Patricio Santos, graduanda em engenharia de alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE

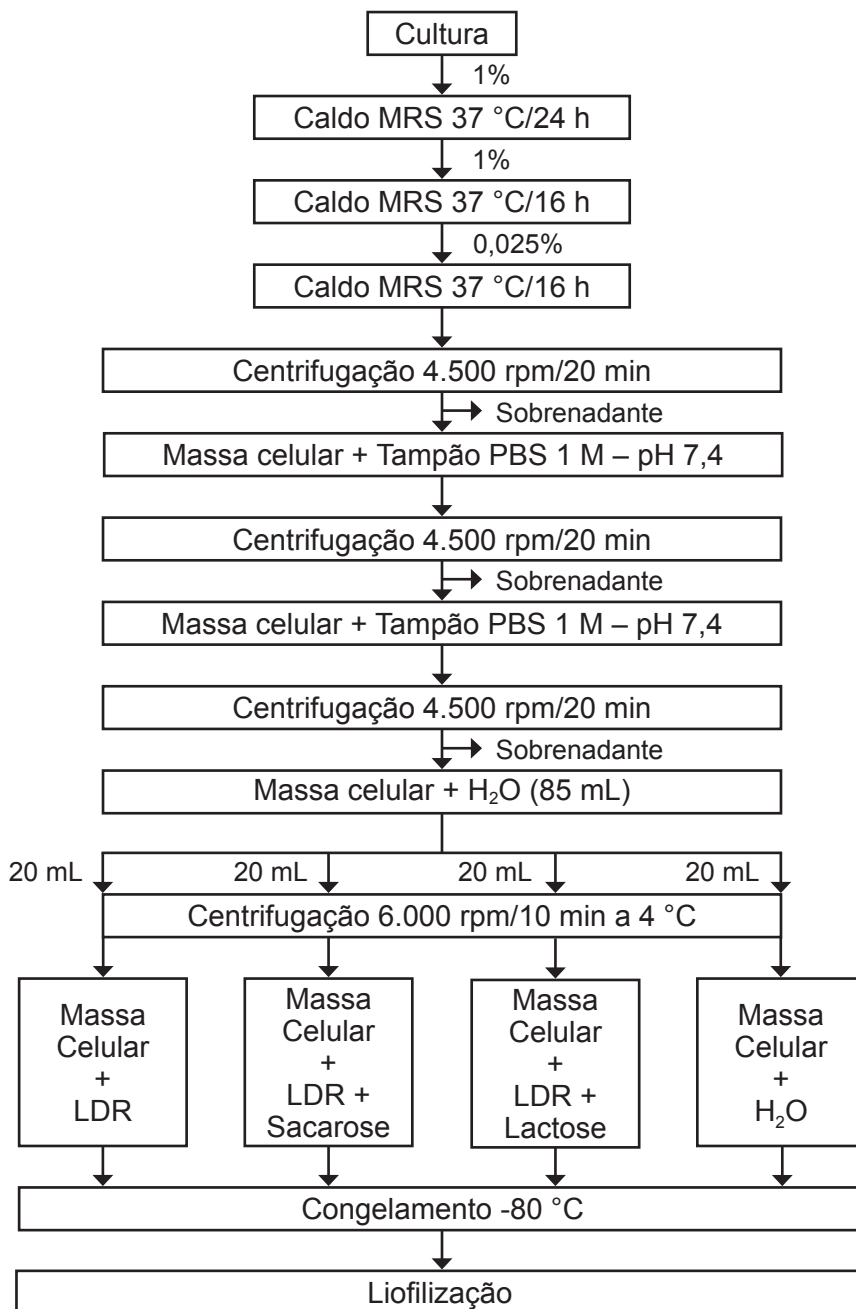
Culturas de *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus rhamnosus* isolados de queijo de coalho artesanal têm demonstrado potencial para serem empregadas como fermento láctico para a produção de queijo de coalho industrializado (Bruno et al., 2017). No entanto, para que essas culturas possam ser empregadas industrialmente, elas precisam ser conservadas por um longo período e de uma forma que viabilize não somente sua estabilidade celular, mas que também proporcione conveniência no transporte, na estocagem e na dosagem das culturas.

Um dos processos de preservação de microrganismos é a liofilização, método no qual a água é removida por sublimação diretamente da cultura congelada e que nos últimos tempos tem adquirido um papel importante na produção comercial de culturas microbianas.

A sobrevivência da bactéria durante o processo de liofilização e a subsequente estocagem são afetadas por alguns fatores, tais como concentração inicial da cultura, meio de cultivo, solução e agentes crioprotetores utilizados na liofilização, além de condições de estocagem, como, por exemplo, temperatura e permeabilidade a gases da embalagem.

Na Figura 1 é apresentado um procedimento para liofilização de cepas de *Lactobacillus* spp. em liofilizador de bandeja, o qual também poderá ser utilizado em outros modelos de liofilizador.

O procedimento consiste em ativar uma cultura estoque de *Lactobacillus*, utilizando-se um inóculo de 1% em caldo MRS (Man, Rogosa e Sharpe) estéril, a 37 °C por 24 horas. Após esse período, retirar 1% da cultura ativada, inocular novamente em caldo MRS e incubar a 37 °C por 16 horas. Em seguida, com o



**Figura 1.** Procedimento para liofilização de cepas de *Lactobacillus* ssp. em liofilizador de bandeja.

intuito de obter uma maior quantidade de células, retirar uma alíquota de 0,025% da cultura ativada e inocular em 800 mL de caldo MRS, a 37 °C por 16 horas.

Após o crescimento, centrifugar todo o conteúdo do frasco a 4.500 rpm/20 min (*Megafuge 40, Thermo Scientific*). Em seguida, descartar o sobrenadante e ressuspender a massa celular em tampão fosfato de sódio (PBS) 1 M, pH 7,4 e centrifugar novamente (4.500 rpm/20 min). Como essa etapa tem o objetivo de concentrar a massa celular, é interessante que o volume de PBS para ressuspender as células seja a metade do volume de caldo usado no cultivo. Repetir o procedimento de lavagem com tampão PBS mais uma vez, seguindo as mesmas condições citadas anteriormente. Após o descarte do sobrenadante, ressuspender a massa celular em 85 mL de H<sub>2</sub>O deionizada estéril. Fracionar a suspensão bacteriana (20 mL) em tubos tipo Falcon e centrifugar a 6.000 rpm/10 min, 4 °C (EBA 12 R, *Hettich zentrifugen*).

Após a centrifugação, descartar o sobrenadante e ressuspender as células em diferentes soluções: LDR (Leite desnatado reconstituído) 10% (20 mL); LDR 10% + Sacarose 6% (20 mL); LDR 10% + Lactose 6% (20 mL); e H<sub>2</sub>O (20 mL) (Otero et. al., 2007). O uso de diferentes meios é importante porque microrganismos de mesmo gênero tendem a ser influenciados diferentemente pelos meios de liofilização, e o LDR ou LDR adicionado de açúcar pode funcionar como meio crioprotetor, dependendo da cepa de *Lactobacillus*. Dessa forma, o meio de liofilização contribui tanto para a viabilidade celular como para a estabilidade da cepa durante a estocagem que acontece depois da liofilização.

Dispensar alíquotas de aproximadamente 6 mL de cada suspensão em placas de vidro estéreis e congelar a -80 °C até o momento da liofilização.

O processo de liofilização é realizado em liofilizador de bandejas (Liotop LP 510, Liobras) e tem duração de 20 horas, seguindo as condições expressas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Programa de liofilização para *Lactobacillus* spp.

|                  | CICLOS |    |     |    |    |    |    |    |    |     |     |     |
|------------------|--------|----|-----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|
|                  | 1°     | 2° | 3°  | 4° | 5° | 6° | 7° | 8° | 9° | 10° | 11° | 12° |
| Temperatura (°C) | -3     | 0  | 3   | 10 | 20 | 30 | 20 | 20 | 20 | 20  | 20  | 20  |
| Rampa (min)      | 30     | 60 | 60  | 60 | 60 | 60 | 30 | 30 | 30 | 30  | 30  | 30  |
| Patamar (min)    | 30     | 60 | 120 | 60 | 60 | 60 | 30 | 30 | 30 | 30  | 90  | 90  |

Colocar o material liofilizado referente ao mesmo tipo de tratamento (LDR, LDR+Sacarose, LDR+Lactose ou H<sub>2</sub>O) em um único tubo falcon. A massa em cada tubo é referente ao volume liofilizado inicialmente (20 mL) de cada suspensão. O material liofilizado é armazenado a 4 °C.

A eficiência do processo de liofilização é mensurada pela contagem do número de células viáveis em Unidades Formadoras de Colônia (UFC/mL) antes da liofilização, imediatamente após o processo e durante o período de tempo que se deseja analisar a estabilidade das células estocadas, em ágar MRS, a 37 °C, 48 horas em anaerobiose.

A avaliação da estabilidade dos liofilizados em H<sub>2</sub>O, LDR, LDR+S e LDR+L de *Lactobacillus plantarum* e *L. rhammosus* indica que ambas as cepas permanecem viáveis após a liofilização e que os meios LDR (10%) + Sacarose (6%) e LDR (10%) + Lactose (6%), quando usados como crioprotetores, permitem que os microrganismos sejam conservados no mínimo por cinco meses, sem redução significativa no número de células viáveis.

## Referências

BRUNO, L. M.; BRIGGILER-MARCÓ, M.; CAPRA, M. L.; CARVALHO, J. D. G.; MEINARDI, C.; QUIBERONI, A. Wild *Lactobacillus* strains: Technological characterisation and design of Coalho cheese lactic culture. **International**

**Journal of Dairy Technology**. v. 70, p. 572-582, 2017.

OTERO, M. C.; ESPECHE, M. C.; NADER-MACÍAS, M. E. Optimization of the freeze-drying media and survival throughout storage of freeze-dried *Lactobacillus gasseri* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* for veterinarian probiotic applications. **Process Biochemistry**. v. 42, p. 1406-1411, 2007.

Exemplares desta edição  
podem ser adquiridos na:

**Embrapa Agroindústria Tropical**  
Rua Dra. Sara Mesquita, 2270, Pici  
60511-110, Fortaleza, CE  
Fone: (85) 3391-7100  
Fax: (85) 3391-7109 / 3391-7195  
www.embrapa.br  
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

**1ª edição**  
(2019): on-line



MINISTÉRIO DA  
AGRICULTURA, PECUÁRIA  
E ABASTECIMENTO



Comitê Local de Publicações  
da Embrapa Agroindústria Tropical

Presidente

*Gustavo Adolfo Saavedra Pinto*

Secretária-executiva

*Celli Rodrigues Muniz*

Secretária-administrativa

*Eveline de Castro Menezes*

Membros

*Marlos Alves Bezerra, Ana Cristina Portugal*

*Pinto de Carvalho, Deborah dos Santos*

*Garruti, Dheyne Silva Melo,*

*Ana Iraidy Santa Brígida,*

*Eliana Sousa Ximendes*

Supervisão editorial

*Ana Elisa Galvão Sidrim*

Revisão de texto

*José Cesamildo Cruz Magalhães*

Normalização bibliográfica

*Rita de Cassia Costa Cid*

Projeto gráfico da coleção

*Carlos Eduardo Felice Barbeiro*

Editoração eletrônica

*José Cesamildo Cruz Magalhães*

Foto da capa

*Laura Maria Bruno*